**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 67 (1976)

**Heft:** 4

**Artikel:** Quelques considérations sur les méthodes spectrométriques de dosage des constituants d'arômes de vanille

**Autor:** Mérat, E. / Vogel, J.

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-982967

**Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

**Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

**Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

**Download PDF:** 22.08.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch**

Trav. chim. aliment. hyg. **67**, 438—447 (1976)
Présenté le 5 avril 1976. Accepté le 29 juillet 1976

# Quelques considérations sur les méthodes spectrométriques de dosage des constituants d'arômes de vanille

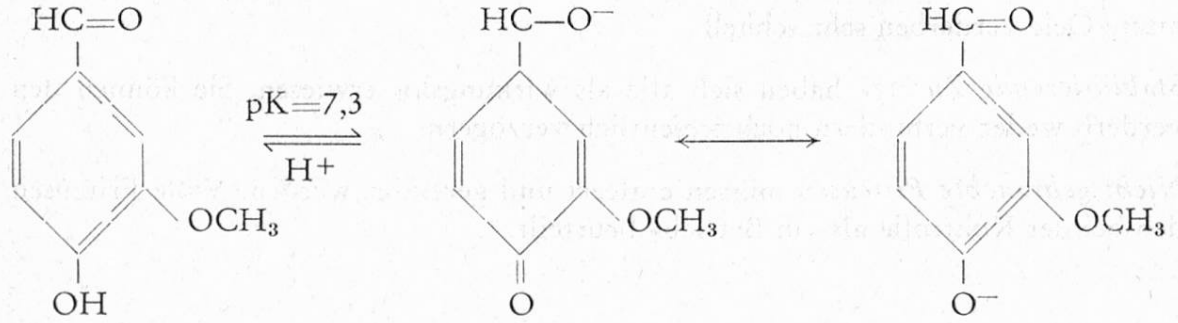
*Dosage par spectrométrie UV: étude d'interférences, dosages simultanés*
*Dosage de la coumarine par spectrofluorimétrie en solution*

*E. Mérat* et *J. Vogel*
Laboratoire cantonal de chimie, Genève

## Interférence de la parahydroxybenzaldéhyde lors du dosage par spectrométrie UV de la vanilline

### *Introduction*

Le projet de chapitre 43 du Manuel suisse des denrées alimentaires (1) décrit deux méthodes de dosage de la vanilline (ou de l'éthylvanilline) par spectrométrie UV en solution aqueuse alcaline. Ces méthodes sont fortement inspirées des méthodes de l'AOAC (2). Il y est signalé que ce dosage doit être effectué en l'absence de coumarine. Mais il n'est pas fait mention d'une interférence de la p-hydroxybenzaldéhyde, plus fréquente que la coumarine dans les extraits ou arômes de vanille ou dans les sucres vanillés. Or il apparaît que la p-hydroxybenzaldéhyde peut avoir une influence non négligeable. Le dosage de la vanilline est en effet fondé sur l'équilibre suivant (3):




On peut appliquer le même équilibre à la p-hydroxybenzaldéhyde avec pK = 7,62 (4).

Les spectres UV des deux composés à pH 5 et 10 démontrent l'existence de l'interférence (fig. 1).

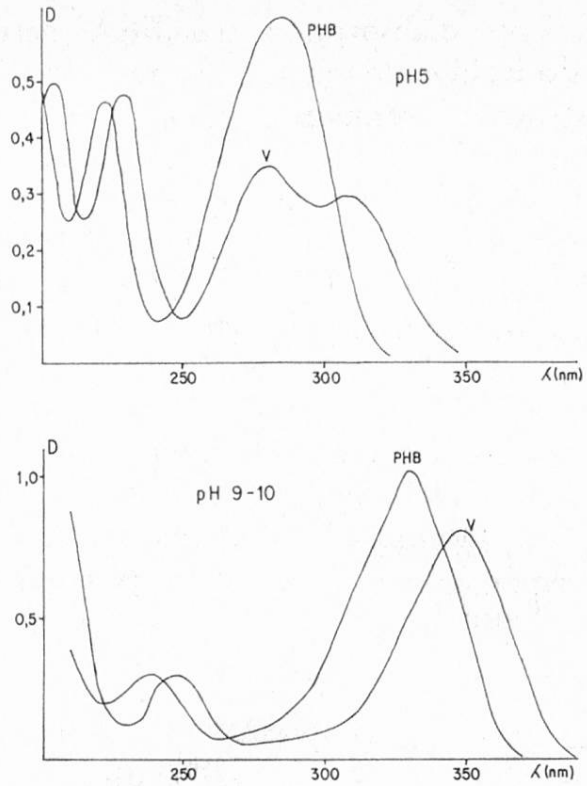



Fig. 1. Spectres UV de p-hydroxybenzaldéhyde (PHB) et vanilline (V) en solutions aqueuses ; concentrations égales : 5 $\mu$g/ml

Cependant, si les deux composés obéissent à la loi de Lambert-Beer et si leurs extinctions sont additives, on peut envisager un dosage simultané, avec mesures aux longueurs d'onde des deux maxima:

$$D_{330} = \varepsilon_{PHB}^{330} \cdot l \cdot c_{PHB} + \varepsilon_{V}^{330} \cdot l \cdot c_{V}$$

$$D_{350} = \varepsilon_{PHB}^{350} \cdot l \cdot c_{PHB} + \varepsilon_{V}^{350} \cdot l \cdot c_{V}$$

avec:

$D_{330}$ : densité optique mesurée à 330 nm

$D_{350}$ : densité optique mesurée à 350 nm

$l$ : épaisseur de la cuve (en cm)

$c_{PHB}$ : concentration de la p-hydroxybenzaldéhyde ($\mu$g/cm$^3$)

$c_V$ : concentration de la vanilline ($\mu$g/cm$^3$)

$\varepsilon_{PHB}^{330}$ : coefficient d'absorption spécifique de la p-hydroxybenzaldéhyde à 330 nm (cm$^2$/$\mu$g)

$\varepsilon_{PHB}^{350}$ : coefficient d'absorption spécifique de la p-hydroxybenzaldéhyde à 350 nm (cm$^2$/$\mu$g)

$\varepsilon_{V}^{330}$ : coefficient d'absorption spécifique de la vanilline à 330 nm (cm$^2$/$\mu$g)

$\varepsilon_{V}^{350}$ : coefficient d'absorption spécifique de la vanilline à 350 nm (cm$^2$/$\mu$g).

Une fois les coefficients d'absorption spécifique déterminés expérimentalement au moyen d'une droite d'étalonnage, le système de deux équations avec les inconnues $c_{PHB}$ et $c_V$ est facile à résoudre:

On a, pour $l = 1$ cm

$$D_{330} = \varepsilon^{330}_{PHB} \cdot c_{PHB} + \varepsilon^{330}_{V} \cdot c_V \qquad (A)$$

$$D_{350} = \varepsilon^{350}_{PHB} \cdot c_{PHB} + \varepsilon^{350}_{V} \cdot c_V \qquad (B)$$

L'équation (A) donne:

$$\boxed{c_{PHB} = \frac{D_{330} - \varepsilon^{330}_{V} \cdot c_V}{\varepsilon^{330}_{PHB}}}$$

(C), qui est introduit dans (B):

$$D^{350} = \varepsilon^{330}_{PHB} \left( \frac{D_{330} - \varepsilon^{330}_{V} \cdot c_V}{\varepsilon^{330}_{PHB}} \right) + \varepsilon^{350}_{V} \cdot c_V$$

et l'on obtient:

$$\boxed{c_V = \frac{\varepsilon^{330}_{PHB} \cdot D_{350} - \varepsilon^{350}_{PHB} \cdot D_{330}}{\varepsilon^{350}_{V} \cdot \varepsilon^{330}_{PHB} - \varepsilon^{330}_{V} \cdot \varepsilon^{350}_{PHB}}} \qquad (D)$$

La concentration en vanilline est donnée en introduisant les valeurs mesurées dans l'équation (D).

Pour déterminer la concentration en p-hydroxybenzaldéhyde, on introduit la valeur de $c_V$ trouvée en (D) dans l'équation (C).

## *Partie expérimentale*

### *Réactifs*

Vanilline, Fluka, puriss.
p-Hydroxybenzaldéhyde, Fluka, purum.
Hydroxyde de sodium, Merck pro anal.
Ethanol, rectifié par distillation.

### *Appareillage*

Spectrophotomètre UV-visible, Perkin Elmer 124 ou équivalent, muni d'un enregistreur graphique.

Cuves de quartz de 1 cm.

*Mode opératoire*

On procède selon (2) en prenant comme «blanc» le mélange des réactifs purs.

Les solutions-mères des produits purs sont préparées par dissolution de 100 mg de vanilline, respectivement de p-hydroxybenzaldéhyde, dans 5 ml d'éthanol, puis dilution à 100 ml avec de l'eau. Les courbes d'étalonnage sont établies (domaines de concentrations: voir résultats) aux deux longueurs d'onde de 330 et 350 nm pour chaque solution (contenant 2 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 N pour 100 ml). La pente des droites d'étalonnage permet de calculer les coefficients d'absorption spécifique.

Pour les mélanges, on procède de la même manière, en effectuant pour chaque échantillon deux mesures, à 330 et 350 nm. Pour calculer les concentrations en vanilline et p-hydroxybenzaldéhyde des solutions examinées, on introduit les valeurs des densités optiques mesurées, $D_{330}$ et $D_{350}$, dans les équations (C) et (D) du paragraphe introduction.

## *Résultats*

Nous avons établi les droites d'étalonnage selon la méthode décrite ci-dessus pour des concentrations variant de 1 à 5 µg/ml pour la vanilline et de 0,3 à 1,0 µg/ml pour la p-hydroxybenzaldéhyde. Ces mesures ont permis de calculer les coefficients d'absorption spécifique suivants:

| | $\varepsilon^{330}$ | $\varepsilon^{350}$ |
|---|---|---|
| Vanilline | 0,10 | 0,16 |
| p-hydroxybenzaldéhyde | 0,20 | 0,08 |

En nous fondant sur les valeurs ainsi obtenues, nous avons entrepris de doser simultanément les deux constituants dans des solutions les contenant en proportions semblables à celles qu'on peut trouver dans des extraits naturels, c'est-à-dire ayant un pourcentage relatif de p-hydroxybenzaldéhyde voisin de 7,5 (5).

Ce pourcentage se calcule de la manière suivante:

$$\% \text{ PHB} = \frac{c_{PHB} \cdot 100}{c_{PHB} + c_V}$$

Les résultats figurent dans le tableau 1. A titre de comparaison, les valeurs obtenues selon la méthode prévue dans le Manuel suisse des denrées alimentaires, avec droite-étalon (1, 2), sont indiquées dans le même tableau.

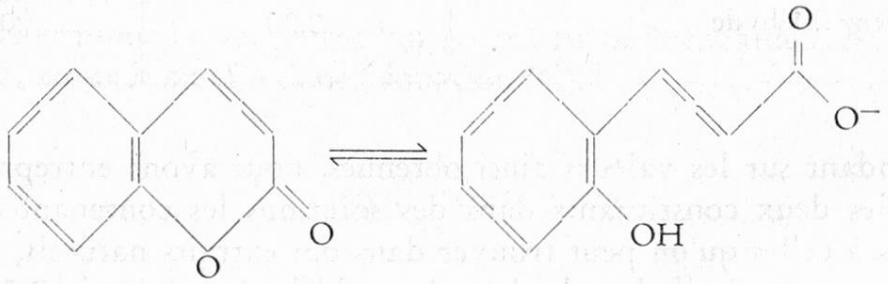
*Tableau 1. Dosage de la vanilline et de la p-hydroxybenzaldéhyde*

| Concentration réelle (μg/ml) | | %PHB | Détermination par système d'équations (μg/ml) | | Détermination selon (1) et (2) (μg/ml) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $c_{PHB}$ | $c_V$ | | $c_{PHB}$ | $c_V$ | $c_{PHB}$ | $c_V$ |
| 0,5 | 2,0 | 20 | 0,56 | 2,0 | non déterminé | 2,3 |
| 0,25 | 3,75 | 6,25 | 0,30 | 3,94 | | 4,15 |
| 0,5 | 5,0 | 9,1 | 0,55 | 5,24 | | 5,55 |
| | | | Erreur sur la détermination (%) | | | |
| | | 20 | 12 | 0 | non déterminé | 15 |
| | | 6,25 | 22 | 5 | | 10 |
| | | 9,1 | 11 | 4,8 | | 11 |

Ces résultats montrent que le calcul par le système d'équations permet une nette diminution de l'erreur sur le dosage de la vanilline en présence de p-hydroxybenzaldéhyde dans des solutions ne contenant que ces deux constituants.

**Interférence de la coumarine lors du dosage par spectrométrie UV de la vanilline**

Dans les conditions de dosage de la vanilline selon (1) et (2), à pH 9—10, la coumarine s'hydrolyse selon




coumarine acide coumarique

La spectrométrie UV permet de suivre cette hydrolyse (fig. 2). Il semble exclu de pouvoir travailler de manière assez rapide et reproductible pour éviter l'interférence vanilline-coumarine, bien que le coefficient d'absorption spécifique de l'acide coumarique soit cinq fois moindre à 350 nm que celui de la vanilline. Il est néanmoins possible de doser la coumarine en présence de vanilline par spectrofluorimétrie.

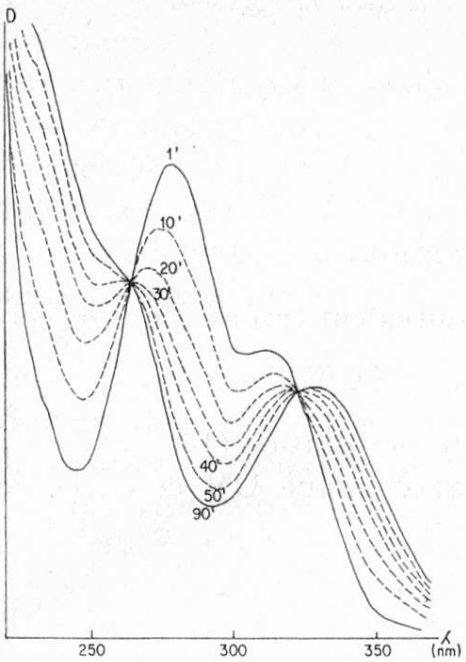



Fig. 2. Hydrolyse de la coumarine en milieu alcalin ; évolution du spectre d'absorption UV en fonction du temps.

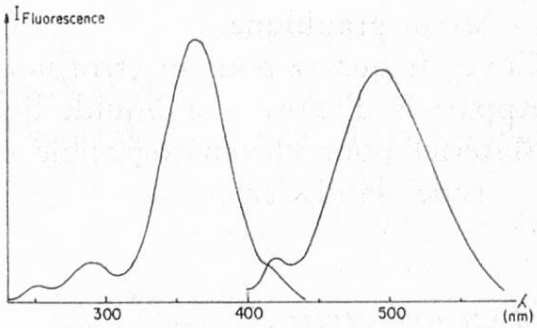



Fig. 3. Spectres d'absorption (excitation) et de fluorescence après hydrolyse alcaline de la coumarine.

## Dosage spectrofluorimétrique de la coumarine

### *Introduction*

Déjà en 1950, *R.-H. Goodwin* et *F. Kavanagh* (6) signalent la fluorescence verte de la coumarine aux pH supérieurs à 10. Depuis, de nombreux auteurs ont étudié et utilisé à fin d'analyse qualitative ce phénomène (1, 7, 8). *E. Martin* et *C. Berner* (9) proposent une méthode de dosage par mesure de la fluorescence in situ, après chromatographie sur couche mince.

Nous utilisons une méthode de dosage de la coumarine contenue dans des arômes et denrées alimentaires par spectrofluorimétrie en solution.

### *Partie expérimentale*

*Réactifs*

Coumarine, pure, Givaudan
Silicagel GF 254, Merck pour chromatographie sur couche mince
Hydroxyde de sodium, Merck pro anal.
— solution d'hydroxyde de sodium: 1N dans l'eau distillée
Acide perchlorique, Merck pro anal.
— solution d'acide perchlorique: 10% dans l'eau distillée
Ethanol, pur, rectifié par distillation
Chlorure de méthylène, pur, rectifié par distillation

Chloroforme, pur, rectifié par distillation
n-Hexane, pur, rectifié par distillation
Acétate d'éthyle, pur, rectifié par distillation.

*Appareillage*

Spectrofluorimètre, Hitachi-Perkin Elmer 204 ou équivalent, muni d'un enregistreur graphique.
Cuves de quartz pour spectrofluorimétrie, 10 mm
Appareils d'extraction liquide-liquide en continu par perforation (10)
Matériel pour chromatographie sur couche mince, avec lampe UV et cuves de type «sandwich».

*Mode opératoire*

Les mesures spectrofluorimétriques se font en milieu alcoolique alcalin: hydroxyde de sodium 0,1 N dans l'éthanol à 80 vol%. Les solutions-étalons de 1 à 50 ng/ml sont préparées à partir d'une solution-mère alcoolique à 0,5 mg coumarine/ml que l'on dilue avec de l'alcool ethylique et de l'hydroxyde de sodium 1N. Il importe d'attendre environ 30 minutes avant d'effectuer une mesure, afin que l'hydrolyse du cycle lactonique soit quantitative et que l'on obtienne des résultats reproductibles. Les spectres présentent une absorption maximale à 365 nm et une fluorescence maximale à 495 nm (fig. 3).

Dans les conditions définies ci-dessus, on peut travailler près du milieu de l'échelle de sensibilité de l'appareil (sensitivity 8×1) de façon à ce que la mesure

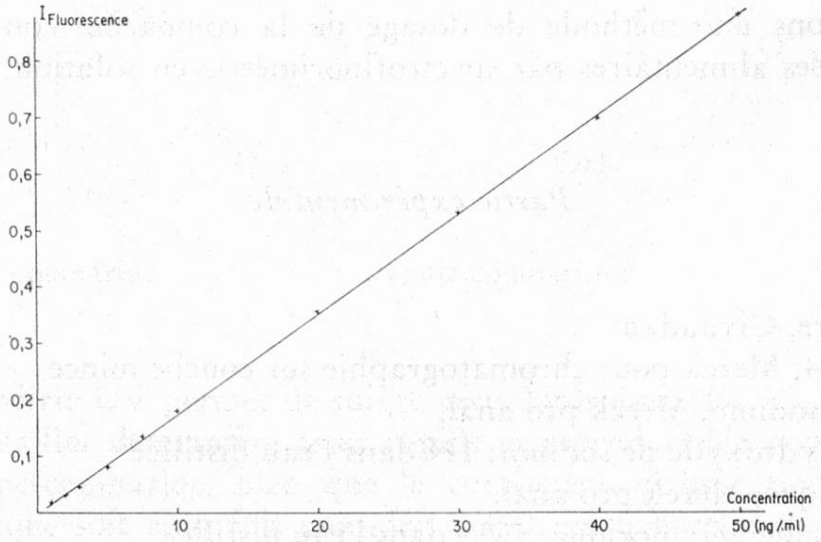



Fig. 4. Dosage spectrofluorimétrique de la coumarine; droite d'étalonnage $I_{Fluorescence} = f(\text{concentration})$ $\lambda_{exc}$ 365 nm $\lambda_{anal}$ 495 nm; sensibilité 8×1, solution Ethanol 80%, NaOH N/10.

à blanc reste négligeable tout en assurant une bonne sensibilité (voir fig. 4: droite d'étalonnage).

Avant de procéder au dosage de la coumarine contenue dans les arômes ou les denrées alimentaires, il convient de s'assurer par chromatographie sur couche mince de l'absence de substances interférentes, particulièrement de coumarines substituées, dans l'arôme ou l'extrait.

Les conditions suivantes nous ont permis d'obtenir une bonne séparation d'interférents possibles:

Support: silicagel GF 254, épaisseur: 0,5 mm
Solvant de migration: n-hexane + acétate d'éthyle (5 + 2)
Révélation: hydroxyde de sodium à 10% dans l'alcool; les taches fluorescentes sont visibles sous UV à 366 nm

Résultats:

| Substance | Rf | λfluorescence |
|---|---|---|
| Coumarine | 0,46 | 495 nm |
| 6-méthylcoumarine | 0,50 | 510 nm |
| 6-éthylcoumarine | 0,56 + 0,64 | 510 nm |

La dihydrocoumarine, la 3-méthylcoumarine, la vanilline ne présentent pas de fluorescence verte dans nos conditions de travail.

Pour doser la coumarine dans les arômes et eaux-de-vie, il suffit de diluer le produit à analyser de façon à se mettre dans les conditions décrites ci-dessus pour les solutions-étalons et permettant la mesure spectrofluorimétrique. Dans le cas de denrées complexes, il convient tout d'abord d'en extraire la coumarine.

Voici les conditions qui nous ont permis d'extraire la coumarine des produits laitiers, tels que glaces, yoghourts, desserts:

On traite 50 g de produit homogène par 100 ml de solution aqueuse d'acide perchlorique. Après agitation, on centrifuge. La solution perchlorique est ensuite soumise à une perforation par le chlorure de méthylène pendant au moins 4 heures. On recueille le chlorure de méthylène et concentre l'extrait par évaporation à 40°C. On peut alors procéder à la chromatographie sur couche mince. En l'absence d'interférences, l'extrait concentré (0,5 ml) est directement repris par la solution alcoolique d'hydroxyde de sodium 0,1 N et la coumarine est dosée par spectrofluorimétrie. En cas de présence d'interférents, il convient de récupérer le spot dû à la coumarine, puis de l'éluer au moyen d'un dispositif approprié (9, 11). L'usage d'étalons internes de coumarine permet de vérifier le rendement de l'extraction (80% pour 1 ppm de coumarine).

Cette technique est notablement plus rapide, sensible et spécifique que la chromatographie en phase gazeuse.

## *Résultats*

La méthode a été appliquée au dosage de la coumarine dans diverses denrées et arômes avec les résultats suivants:

| | |
|---|---|
| arôme cerise A | 1,0% |
| arôme cerise B | 7,2% |
| arôme toffee-cacao | 4,4% |
| arôme noix de coco | 13% |
| yoghourt, arôme caramel | 0,9 ppm |
| dessert caramel | non décelé |
| bitter aux herbes | non décelé |
| vodka A | 19 ppm |
| vodka B | 8,3 ppm |


## *Résumé*

On étudie certaines interférences rencontrées lors du dosage par spectrométrie UV de la vanilline et un dosage simultané de la vanilline et de la p-hydroxybenzaldéhyde par cette méthode. On décrit une méthode de dosage spectrofluorimétrique de la coumarine dans les arômes et les denrées alimentaires.

## *Zusammenfassung*

Manche Störungsmöglichkeiten der UV-spektrometrischen Bestimmung von Vanillin und ein gleichzeitiges Bestimmungsverfahren von Vanillin und p-hydroxybenzaldehyd werden diskutiert. Eine spektrofluorimetrische Bestimmungsmethode von Cumarin in Lebensmitteln und Aromastoffen wird beschrieben.

## *Summary*

Some interferences met during the UV spectrometric determination of vanillin, and a simultaneous of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde by that method are discussed. A spectrofluorimetric method for quantitative determination of coumarin contained in foodstuffs and flavouring substances is described.


## *Bibliographie*


1. Manuel suisse des denrées alimentaires, vol. II, chapitre 43 2e projet (1971), non publié.
2. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C., p. 312 methodes 19 008-19 013 (1970).
3. *Englis, D.-T.* and *Wollerman, L.-A.:* Significance of pH in determination of vanillin by UV absorption. Anal. Chem. **29**, 1151—1153 (1957).

4. Stability constants, Supplement No 1, special publication 25. The Chemical Society, London 1971.
5. *Chaveron, H.:* Université de technologie de Compiegne, communication personnelle.
6. *Goodwin, R.-H.* and *Kavanagh, F.:* Fluorescence of coumarin derivatives as a function of pH. Arch. Biochem. **27**, 152—173 (1950).
7. *Udenfriend, S.:* Fluorescence assay in biology and medicine (revue). Academic Press, New York-London 1962.
8. *Passwater, R.-A.:* Guide to fluorescence literature. Plenum Press Data Division, New York 1967.
9. *Martin, E.* et *Berner, C.:* Séparation, identification et dosage de la coumarine dans les arômes à base d'huiles essentielles d'agrumes. Trav. chim. aliment. hyg. **62**, 367—376 (1971).
10. Manuel suisse des denrées alimentaires, vol. II, chapitre 22C/10, p. 51 (1967).
11. *Merat, E.* et *Vogel, J.:* Séparation et dosage spectrofluorimétrique de l'anthranilate de méthyle et du N-méthyl anthranilate de méthyle dans diverses boissons et arômes. Trav. chim. aliment. hyg. **66**, 496—501 (1975).

Dr E. Mérat
Dr J. Vogel
Laboratoire cantonal de chimie
Institut d'Hygiène
22, quai Ernest Ansermet
*CH - 1211 Genève 4*